

ENDOTHELIN GÉN EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA ENDOTHEL- ÉS SZÍVIZOMSEJTEKEN

Doktori tézisek

Dr. Keltai Katalin

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Program: Szív- és érrendszeri betegségek élettana és klinikuma



Témavezetők: Dr. Merkely Béla egyetemi tanár, az MTA doktora és
Dr. Cervenak László tudományos főmunkatárs, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Tóvári József tudományos osztályvezető, PhD
Dr. Kempler Péter egyetemi tanár, az MTA doktora.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Somogyi Anikó egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lőrincz István tanszékvezető egyetemi docens, PhD
Dr. Mózes Miklós egyetemi adjunktus, PhD

Budapest
2012

1. Bevezetés

Yanagisawa és munkatársai 1988-ban írták le az endothelium által termelt vasokonstriktor peptidet, melyet endothelinnek neveztek el. További kutatások hamarosan tisztázták, hogy nem egyetlen peptidről van szó, hanem egy fehérje családról, aminek eddigi ismereteink szerint három tagja van: az endothelin-1 (ET-1), az endothelin-2 (ET-2) és az endothelin-3 (ET-3).

Az endothelinek fiziológiás és patológiás szerepe kiterjedt kutatások tárgya, de még nem minden részletében tisztázott. A szervezet számos szervében és szövetében képződnek; autokrin, parakrin és endokrin hatással rendelkeznek. Az endothelinek bioszintézisének legfontosabb helye a vaszkuláris endothelium. ET-1-et termelnek még a szív, a veseglomerulus mesangialis és epithel sejteji, az agy, a gerincvelő és az aorta simaizomsejtjei is. A 6-os kromoszómán elhelyezkedő ET-1 gén átírását az angiotenzin II, a katekolaminok, a növekedési faktorok, az inzulin, a thrombin, az oxidált LDL vagy a hypoxia serkentik pl. PKC-n keresztül, míg az atrialis natriuretikus peptid (ANP), az ET-3 és a prosztanoidok a peptid szintézisére gátlóan hatnak (cGMP-szint növelés következtében kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -szint csökkenés által).

Különböző stimulusok, mint például az oxidatív stressz, a hypoxia, az ischaemia, a nyíró erők indukálják a peptid messenger-RNS (mRNS)-ének transzkripcióját, ezzel percek alatt szintetizálódik és szekretálódik az ET-1. Az aktív endothelin képzés létrejöhet intracellulárisan, pl. a Golgi apparátusban, valamint sejtmembrán szinten, pl. a simaizomsejtek vagy az endothelsejtek felszínén. A keletkezett ET-1 több mint 75 %-a abluminálisan szecernálódik, ahol könnyen eléri a vaszkuláris media simaizomsejtjein található receptorait, tehát inkább tartható parakrin hatásúnak, mint endokrin hormonnak.

Az endothelin receptorok eloszlása szövet- és sejt-specifikus. Az ET(A) receptorok nagy számban vannak jelen az erek simaizomsejtjein, a szívizomsejteken, a szív fibroblasztjaiban, az endothelsejteken azonban nem találhatók meg. Döntően a vazokonstriktó kialakulásában játszik szerepet. Az ET(B) receptorok inkább az endothelsejteket dominálják, és innen továbbítják az endothelin hatás negatív visszacsatolását.

Az endothelinek komplex, magasan szabályozott sejten belüli jelátviteli rendszereket aktiválnak. Következésképpen rövid távú hatások, mint például a simaizomsejt-kontrakció vagy vazoaktív anyagok elválasztását serkentő hatás, illetve hosszú távon kialakuló hatások, mint például proliferáció és migráció alakulnak ki.

Az ET-1 a ma ismert egyik legerősebb vazokonstriktor és fiziológiai szerepet játszik az erek bazális tónusának fenntartásában és a normál vérnyomás beállításában. Proliferációt serkentő, mitogén hatása van az érfal media simaizomsejtjein és szívizomsejteken és hatásosan serkenti a monociták migrációját, fagocitózist és citokintermelését (TNF, IL, GM-CSF), ami a makrofágok aktiválásán keresztül gyulladásos sejtválaszt vált ki. Pathogenetikai szerepet tulajdonítanak az ET-1-nek a csontmetasztázis-képzésben, az angiogenezisben, az apoptózis szabályozásában és az oxigénhiányok termelődésében.

Az ET-1 szerepe miokardiális infarktusban kettős, egyrészt oki szerepe lehet az infarktus kialakulásában az atherosclerosis, endothel diszfunkció útján, másrészt az infarktus bekövetkeztével stabilizáló hatása van, elősegíti a hegeképződést. Kemotaktikus hatására makrofágok és neutrofil sejtek jelennek meg. Miokardiális infarktus után az ET-1 hatására fokozódik a fibroblast proliferáció, az adhéziónak molekulák expressziója és az extracelluláris mátrix depozíció, melyek összessége a myocardium fibrózisát okozza, a posztinfarktusos remodelling és hegeképződés részeként. Ugyanakkor az ET-1 magas szintje kedvezőtlen a koronária keringésre, mert direkt vazokonstriktort, növekedési faktorok aktiválásával simaizomsejt proliferációt okoz, stimulálja a trombociták aggregációját, intima hiperpláziát, fokozott kollagén-1 szintézist idéz elő.

Az ereket az egy sejtsor vastagságú vaszkuláris endothelium béleli, melynek fizikai barrier funkciója mellett aktív hemodinamikai és biokémiai feladatai vannak. Ide tartozik a vaszkuláris tónus és struktúra fenntartása, a vaszkuláris sejtek növekedésének, a trombotikus és a fibrinolitikus folyamatoknak, a gyulladásos és immunfolyamatoknak, a fehérvérsejtek és a trombociták adhéziójának, a vaszkuláris permeabilitásnak, az oxidációs–redukációs folyamatoknak a szabályozása, a lipidoxidáció befolyásolása. Mivel a keringő vérral direkt kapcsolata van, az endothelium károsodhat az intravénásan adott anyagok, pl. chemoterápiás szerek által.

Az anthracyclinek (doxorubicin (DXR)) kardiavaszkuláris toxikus hatása széles körben ismert, kevés ismerettel rendelkezünk azonban az anthracyclinek vaszkuláris károsodást, endothel diszfunkciót okozó hatásáról, melyek részben akut, részben krónikusan jelentkeznek. Az anthracyclinek toxicitásának pontos mechanizmusa teljes részletességében még nem tisztázott, mai ismereteink szerint valószínűleg multifaktoriális. Részben direkt DNS-károsító hatása (interkaláció, alkilálás, cross linking), részben direkt membránhatások, részben szabadgyök képződés ill. apoptózis indukció ismertek.

Munkacsoportunk DXR-rel kezelt limfómás betegek vizsgálatakor az anthracyclin kezelést követően az ET-1 plazma szint szignifikáns csökkenését találta. Az ET-1 szint csökkenés az

anthracyclin direkt citotoxikus hatásának következménye lehet, részben az endothelialis m-RNS szintézis gátlása, részben az endothel diszfunkciót okozó szuperoxid ágensek keletkezése révén.

Az ET-1 szint csökkenése következtében az ET-1 esetleges citoprotektív hatása is eliminálódik, így az anthracyclin kardiotoxikus hatása könnyebben kifejlődik.

2. Célkitűzés

Mint a bevezetőben részletezték mutatják, az ET-1 pathogenetikai szerepét a kardiovaszkuláris betegségekben széles körben tanulmányozták. A következtetéseket állatkísérletes modellekből illetve humán plazmaszint meghatározásokból vonták le. A plazmában mérhető értékek a peptid gyors lebomlása ill. abluminalis szekréciója miatt nem minden esetben tükrözik a valós helyzetet. Vizsgálataink során munkacsoportunk korábbi, DXR-rel kezelt limfómás betegekből származó eredményei nyomán az ET-1 szerepét kívántuk direkt módon vizsgálni *szívizomsejteken*. Ehhez először kutyában kialakított ischaemia/reperfúzió modellt használtunk. Az ET-1-ről ismert, hogy mértékével arányos az infarktus nagysága és az ischaemia indukálta kamrai aritmiák előfordulása, de a cardiomyocyták apoptózisának gátlásával szerepe van a szöveti regenerációban is. A kutya modellt az emberhez igen hasonló coronariarendszer miatt választottuk.

Az alábbi célokat tűztük ki:

- 1. Pontos és érzékeny RT-PCR módszer kidolgozása az ET-1 mRNS képződés detektálására.**
- 2. A plazma ET-1 és big ET-1 szintjének változásának vizsgálata ischaemia ill. reperfúzió hatására.**
- 3. A szívizomsejtek ET-1 mRNS szint változásának vizsgálata ischaemia ill. reperfúzió hatására.**

Második kísérleti rendszerünkben DXR-rel kezelt limfómás betegpopuláción kapott eredmények alapján a DXR direkt hatását vizsgáltuk az ET-1 és egyéb, a kardiovaszkuláris betegségekben érintett gének expressziójára *endothelsejtekben*. Az endothelsejteket, mint a toxikus károsító hatással első vonalban találkozó sejteket választottuk ki.

Az alábbi célokat tűztük ki:

- 1. DXR citotoxicitásának meghatározása endothelsejteken különböző időpontokban, a DXR direkt hatásának vizsgálatára alkalmas kezelési idő kiválasztására**
- 2. A maximális citotoxikus koncentráció meghatározása különböző DXR kezelési időtartamok mellett.**

3. Az endothelsejtek DXR indukálta, a kardiovaszkuláris rendszerre jellemző, számos kardiovaszkuláris betegség által befolyásolt génjeinek expressziós mintázatának meghatározása cDNS array segítségével.
4. ET-1 mRNS expresszió vizsgálata DXR-rel kezelt endothelsejteken qPCR módszerrel.
5. A metodika validálása ugyanolyan körülmények között DXR-rel kezelt HeLa sejtek vizsgálatával.
6. Az eredmények validálása a hatásért végeredményben felelős termék, a bigET-1 fehérje változásának meghatározásával DXR-rel kezelt endothelsejteken.
7. A DXR endothelsejtekre kifejtett hatásának szélesebb körű vizsgálatára microarray rendszerrel a teljes genetikai állomány expressziós profiljának meghatározása, az ET-1 gén kapcsolati hálójának feltérképezése

3. Módszerek

3.1. Kutyaszív ischaemia/reperfúziós modell

A vizsgálatot 9 mindkét nembeli keverék kutyán végeztük. Általános anesztézia, endotrachealis intubálás, kontrollált lélegeztetést követően thoracotomiát végeztünk, izoláltuk a bal elülső leszálló artériát (LAD). A LAD II. diagonális ága alá egy hurkot helyeztünk el a későbbi lefogáshoz. A LAD 30 perces lefogása után további 90 perces reperfúziós időszakot figyeltünk meg. Vér- és szívizommintát vettünk a LAD lefogása előtt, közvetlenül a felengedés után és a reperfúzió 90. percében. Az ET-1 és big-ET plazmaszintek meghatározásához az a. femoralisba és a sinus coronariusba katétereket vezetünk be, és mintát vettünk a következő időpontokban: kontroll, ischaemia 30. perc, reperfúzió 90. perc. Az ET-1-t és big-ET-1-t a plazmából immunprecipitációval tisztítottuk, a plazmaszinteket Western blot módszerrel határoztuk meg. Az ET-1 mRNS szöveti szintjének meghatározása RT-PCR-rel történt. Az alkalmazott primereket online terveztük. A PCR termék azonosítását először molekulasúly alapján 0,8%-os horizontális agaróz gél elektroforézissel végeztük, hogy meggyőződjünk a specificitásról, majd szekvenálással ellenőriztük.

Endothelsejt kultúrán végzett kísérletek

Az endothelsejtek preparálását és tenyésztését munkacsoportunk által korábban leírt módszer szerint végeztük. A SuperArray és a real-time PCR (RTPCR) kísérletekhez a sejteket 80 cm²-es szövetkultúrákban ill. 24-lyukú lemezen tenyésztettük és akkor használtuk fel, ha a konfluencia 90%-ot elérte. A HeLa sejteket DMEM mediumon tenyésztettük. Az endothelialis cytotoxicitást Herczenik és munkatársai által leírt módszer szerint értékeltük. A SuperArray teszthez a sejteket homogenizáltuk, kloroformos extrakció után a teljes RNS tartalmú vizes fázist tisztítottuk. Oligo d(T)₂₃ primer hozzáadásával és Biotin-16-dUTP beépítésével az mRNS szálakat jelölt komplementerekké szintetizáltattuk M-MLV reverz transzkriptáz enzimmel, a jelzett cDNS-t egy éjszakán át hibridizáltuk. A hibridizálódott, jelölt molekulákat mosásokat követően dt-reptanidin-alkalikus foszfatáz konjugátummal felismertettük, majd az enzimatiság vég segítségével kemilumineszcens jeleket generáltattunk. A kemilumineszcens adatokat Genesis 1.5.0 segítségével elemeztük. Az mRNS szinteket a belső standardként használt GAPDH gén kifejeződésének arányában fejeztük ki. A LightCycler analízishez az RNS-t a fent leírt módon izoláltuk. A cDNS

kvantifikációjához LightCycler FastStartDNA Master SYBR Green I kitet alkalmaztunk LightCycler® 1.5 készüléken. Az általunk alkalmazott qPCR metodika további validálására pozitív kontrollként HeLa sejteket alkalmaztunk, mivel ezen sejtek ismertén fokozott ET-1 mRNS expresszióval válaszolnak a DXR hatásra. Az mRNS eredmények (SA és qPCR) kontrolljaként az ET-1 termelődését kereskedelmi forgalomban kapható big-ET-1 sandwich ELISA technikával ellenőriztük. A vizsgálatot a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A DXR endothelsejtekre kifejtett hatásának szélesebb körű vizsgálatára microarray technikával a teljes genetikai állomány expressziós profilját határoztuk meg Agilent GE microarray technikával. A kapott kép file-t az Agilent Feature Extraction program segítségével adat file-ra konvertáltattuk, majd az Agilent GeneSpring GX 11.5.1 program segítségével statisztikai és ortológiai kiértékelést hajtottunk végre. Az irodalomban a microarray-k validálására qPCR módszert használnak. A mi esetünkben többszáz gén expresszió változását figyeltük meg, mindegyik mRNS-re külön qPCR végzése nem volt lehetséges, ezért egy más technológiai bázisra épülő microarray-vel (Affymetrix) igazoltuk az eredményeinket.

4. Eredmények

Kutyaszív ischaemia/reperfúzió modell

Ischaemia alatt a plazma ET-1 és big ET-1 szint nem változott szignifikáns mértékben. Az ET-1 gén expresszió a szívizomban ischaemia során 57,8 %-kal csökkent a kiindulási értékhez képest. Reperfúzió alatt szignifikáns emelkedést észleltünk a plazma ET-1 értékekben mind a kiinduláshoz, mind a 30 perces ischaemiához képest. A big ET-1 is hasonlóan változott (Kontroll vs. reperfúzió 90: ET-1, 15.2 ± 4.18 fmol/mL vs. 23.2 ± 5.23 fmol/mL, $P < 0.01$; big ET-1, 14.7 ± 5.9 fmol/mL vs. 27.2 ± 7.1 fmol/mL, $P < 0.001$). A fentiekkel párhuzamosan az ET-1 mRNS szint növekedését is észleltük (az ischaemiás érték 322 %-ára, ill. a kiindulási érték 244 %-ára).

Endothelsejtkultúra

A DXR toxicitása endothelsejteken

Jelentős, nem specifikus mRNS lebomlás figyelhető meg mind apoptózis, mind nekrosis során, mely a gén expresszió változásának téves értelmezését vonhatja maga után. Ennek elkerülése érdekében szükségesnek tartottuk a DXR citotoxicitásának meghatározását különböző időpontokban. Az endothelsejteket különböző dózisú DXR-rel kezeltük 2, 4, 6 24 és 48 h időtartamban 96-lyukú sejtenyésztő lemezen. Kétféle módszert alkalmaztunk. A morfológiai módszer során az átlagos túlélési score-t (0 - 4) vetettük össze a DXR koncentrációval. A másik módszer során az élő sejtek számával arányos fluoreszcenciát mértük és a viabilitást sejtszám kalibráció segítségével számoltuk. A maximális citotoxikus koncentráció fele (LD50) az endothelsejtek esetében 150 ng/ml volt 48 h, 300 ng/ml volt 24 h és több mint 10000 ng/ml volt 6 h kezelés során. Tekintettel arra, hogy az onkológiai betegek kezelési protokolljában nagy intravénás dózisokat alkalmaznak, és a DXR csúcs plazma koncentrációja rövid időre az 1000 ng/ml koncentrációt is eléri, további kísérleteink során az endothelsejteket 6 h-n át 1000 ng/ml DXR-rel kezeltük.

DXR hatása az endothelsejtek mRNS expressziós mintázatára.

Az endothelsejtek DXR indukálta gén expressziós mintázatát egy cDNS array-vel (SA) szűrtük, mely a kardiovaszkuláris rendszerre jellemző számos kardiovaszkuláris betegség által

befolyásolt gént tartalmazott. A 96, az array-n szereplő reprezentatív kardiovaszkuláris gén közül csak az ET-1 mRNA expressziója változott meg szignifikáns módon a DXR kezelés hatására. Ugyanebben a kísérleti felállásban pozitív kontrollként használtuk a $\text{TNF}\alpha$ -t, mely - ismert módon – számos adhézis molekula és citokin mRNA expresszióját indukálta.

ET-1 mRNA expresszió DXR-rel kezelt endothelsejteken

Az SA kísérlet során az ET-1 mRNA expresszió 6 órás DXR kezelést (1000 ng/ml) követően a kezeletlen kontroll endothelsejtek expressziójának 10.9%-a volt ($p=0.0049$). Azért választottuk ezt a relatíve rövid (6 h) inkubációs időt, hogy a DXR-nek az endothelsejtekre kifejtett direkt hatásait tudjuk vizsgálni. Az SA során kapott eredmények validálására egy következő kísérletben az endothelsejteket különböző dózisú DXR-rel (300, 600 és 1000 ng/ml) kezeltük és 6 h kezelést követően az ET-1 mRNA expresszióját real-time qPCR módszerrel határoztuk meg. Az ET-1 mRNA gén expresszió dóziszfüggő és az SA során kapott eredményhez nagyon hasonló volt. Mindazonáltal, a qPCR-nak az SA-hoz viszonyított nagyobb érzékenysége miatt az ET-1 mRNA sokkal jelentősebb szupresszióját találtuk: az 1000 ng/ml DXR-rel kezelt endothelsejtekben a kontrollhoz képest az ET-1 mRNA expressziója csak 2.41% volt ($p=0.0022$). Az ET-1 mRNA expressziója szignifikánsan és dóziszfüggő módon csökkent DXR kezelés hatására.

ET-1 mRNA expresszió DXR-rel kezelt HeLa sejteken

Az irodalomban nem ismert, hogy az endothelsejtek ET-1 expressziója miként változik meg az LD50-nél kisebb DXR kezelés hatására. A mi eredményeinkkel ellentétben más sejttypusokat (humán HeLa, patkány szívizomsejt, egér HL-1) alkalmazó vizsgálatok dózis dependens ET-1 indukcióról számolnak be. Metodikánk validálásaként, ugyanolyan körülmények között HeLa sejteket kezeltünk DXR-rel. Az alkalmazott dózissal és a kezelési idővel arányos ET-1 mRNA indukciót találtunk, mely az irodalmi adatoknak megfelel.

A DXR kezelés hatása az ET-1 expresszióra fehérjeszinten

Az ET-1 expresszióját kvantitatívan és pontosan meg lehet határozni az mRNA szintjén. Az ET-1 esetében, a kutyán végzett kísérletünk alapján, az mRNA és a fehérjeszintű meghatározás korrelál, de a hatásért mégis a fehérje a felelős, ezért ennek vizsgálatát is elvégeztük a génszintű eredmények validálása érdekében. Kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével határoztuk meg a big ET-1 fehérje koncentrációkat. Az

endothelsejteket az LD50-nél kisebb DXR dózisokkal (50 and 200 ng/ml) kezeltük, 24 óra inkubálást követően a felülúszót összegyűjtöttük és elvégeztük az ELISA meghatározást. A DXR kezelés szignifikánsan csökkentette a big ET-1 fehérje szekrécióját ($p=0.0101$).

DXR kezelés hatása az endothelsejt genomjára - Microarray eredmények kiértékelése

A fenti eredmények alapján már nem csak az ET-1-t magát, hanem az ET-1-t szabályozó valamint az ET-1 által szabályozott gének hálózatát, és ezen géneknek a DXR-re adott reakcióját kívántuk feltérképezni. Ennek érdekében a teljes genom expressziós mintázatát vizsgálni képes microarray módszert választottunk (Agilent). Az irodalomban a microarray-k validálására qPCR módszert használnak. A mi esetünkben többszáz gén expresszió változását figyeltük meg, mindegyik mRNS-re külön qPCR végzése nem volt lehetséges, ezért egy más technológiai bázisra épülő microarray-vel (Affymetrix) igazoltuk az eredményeinket. A legalább kétszeres expresszióváltozást mutató géneket tartalmazó adatbázison lefuttattunk egy *pathway* analízist, mely a jelenleg ismert irodalmi adatok alapján teremt kapcsolatot az egyes gének között. Elemeztük a főbb csomópontokat adó géneket és összegyűjtöttük azok irodalmilag ismert kapcsolatainak számát. Az ET-1 génkapcsolatai az ötödik legtöbb kapcsolattal rendelkező csomópontot rajzolták ki a rendszerben. A csomóponti analízis azonban nem veszi figyelembe a dózisfüggést, ezért a kétszeres expresszióváltozást mutató géneket tovább szelektáltuk és kiemeltük azokat, melyek a DXR kezelés hatására koncentrációfüggő változást mutattak. További kritériumként csak azokat a géneket vettük figyelembe, ahol a 300 és 600 illetve a 600 és 1000 $\mu\text{g/ml}$ kezelések közötti változás átlagosan legalább 50%-os volt mindkét array-ben (Agilent és Affimetrix). Ezt a háromlépéses szűkítést elvégezve 24 csökkenő és 24 emelkedő expressziójú gént találtunk. Megállapíthattuk, hogy az ET-1 a vizsgált gének között az egyik legtöbb csomóponttal rendelkező gén, ami önmagában is arra utal, hogy az ET rendszer érintett a DXR által. Ezt tovább erősíti, hogy a vele hálózati kapcsolattal rendelkező gének közül 7 hasonló koncentrációfüggő expressziós változást mutatott, mint maga az ET-1.

5. Következtetések

- 1. Kutyaszív ischaemia/reperfúziós modellben kifejlesztettünk egy RT-PCR módszert az ET-1 mRNS termelés pontos meghatározására. A párhuzamosan elvégzett ET-1 és big ET-1 meghatározások az ischaemia ill. a reperfúzió során végbemenő folyamatok jobb megismerésére adtak lehetőséget.**
- 2. Az ischaemiás szívizomszövet ET-1 mRNS gén expressziója csökkent, ami a lebomlás és a hipoxiás sejtek csökkent anyagcseréjének következménye lehet. Az észlelt kismértékű ET-1 és big ET-1 plazmaszint növekedés az ép sejtekből származhat.**
- 3. A gén expresszió fokozódása az ischaemiát követő reperfúzió után gyors fehérjeszintézisre utal, amely részben hozzájárul a reperfúzió során észlelt big ET-1 és ET-1 plazmaszintek növekedéséhez. Ez utóbbi összefüggésben lehet a reperfúziós aritmiák kialakulásával, illetve az akut miokardiális infarktus egyéb szövődményeivel.**

Az endothelsejteken végzett kísérletekben kilencvenhat, kardiovaszkuláris betegségekhez kapcsolható gén expressziójának változását vizsgáltuk meg subletalis dózisú DXR kezelést követően.

- 1. Kimutattuk, hogy rövid ideig tartó DXR kezelés dóziszfüggő módon gátolja az ET-1 mRNS expresszióját. A kemoterápia során alkalmazott magas DXR koncentráció direkt kardiotoxikus hatását tovább növelheti a DXR hatására bekövetkező kezdeti ET-1 termelés csökkenés, ami apoptózisra való nagyobb fogékonyságot jelent.**
- 2. A 96 vizsgált gén közül csak az ET-1 mRNS expressziója változott dóziszfüggően és szignifikáns mértékben.**
- 3. Az endothelsejteken végzett kísérletekben is mind az mRNS, mind a fehérjeszinten azonos irányú változásokat tapasztaltunk. A DXR szignifikánsan csökkentette a bigET-1 szintet.**
- 4. Az endothelsejtben az ET-1-t szabályozó valamint az ET-1 által szabályozott gének hálózatát és ezen géneknek a DXR kezelésre adott reakcióját is feltérképeztük a teljes genom expressziós mintázatát vizsgálni képes microarray módszer segítségével. A DXR kezelés hatására expresszióváltozást mutató gének közül az ET-1 az egyik legtöbb kapcsolattal rendelkezik.**

Kísérleteink során az ET-1 rendszer központi szerepét igazoltuk mind a kutya szívmusclek ischaemiára adott válaszában, mind a humán endothelsejtek DXR kezelésre adott reakciójában. A fentiek vizsgálatára részletesebb, a patomechanizmust érintő kísérletek elvégzése lenne szükséges az ET-1-gyel kapcsolatban, mely által érthetővé válna az ET-1 kardiovaszkuláris rendszerben betöltött, a vérnyomás szabályozásán túlmutató szabályozószerpe is, valamint lehetőség nyílna az endothelin-rendszer gátlásának kifinomultabb alkalmazására.

6. Saját publikációk jegyzéke

Értekezés témájával kapcsolatos közlemények:

K. Keltai, L. Cervenak, V. Makó, Z. Doleschall, A. Zsáry, I. Karádi.

Doxorubicin selectively suppresses mRNA expression and production of endothelin-1 in endothelial cells.

Vasc Pharmacol 2010;53: 209-214.

K. Keltai, H. Vágó, A. Zsáry, I. Karádi, V. Kékesi, A. Juhász-Nagy, B. Merkely.

Endothelin Gene Expression During Ischaemia and Reperfusion.

J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl):S198-201.

Keltai K, Vágó H, Zsáry A, Karádi I, Kékesi V, Merkely B.

Az endotelin gén expresszió miokardiális ischaemia/reperfúzió során.

Magyar Belorvosi Archívum, 2007.60 (2): 160-164.

Keltai K, Zsáry A, Pásztor E, Schneider T, Sármán P, Rosta A, Karádi I, Jánoskúti L.
Pathogenesis and monitoring of anthracycline induced cardiomyopathy: Role of endothelin-1, brain natriuretic peptide and serial echocardiography.

Eur J Heart Fail Suppl (2006) 5(Suppl): 162-163

Zsáry A, Szűcs S, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Fenyvesi T, Karádi I.
Anthracyclines induced cardiomyopathy and endothelins.

Eur J Heart Failure, 2003; Suppl., Vol.2 No. 1. p.15. (110).

Vágó H, Soós P, Zima E, **Keltai K**, Gellér L, Kékesi V, Juhász-Nagy A, Merkely B.

Endothelin-A receptor antagonist LU 135 252 has no electrophysiological and antiarrhythmic effects during myocardial ischaemia-reperfusion in dogs.

Eur Heart J 2002; 23 (Suppl S): 215.

A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Zsáry A, Szűcs S, **Keltai K**, Pásztor E, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Jánoskúti L, Fenyvesi T, Karádi I.

Endothelin-1 and cardiac function in anthracycline treated patients: a one-year follow-up.

J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl1):S372-375.

Szűcs A, Róka A, Soós P, Szilágyi S, Vágó H, **Keltai K**, Dezsi AC, Gellér L, Merkely B.

Effect of Incessant Ventricular Tachyarrhythmias on Serum Endothelin and Big-endothelin Levels.

J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl1):S402-406.

Vágó H, Soós P, Zima Z, Gellér L, **Keltai K**, Róka A, Kékesi V, Juhász.-Nagy A, Merkely B.

Changes of endothelin-1 and big-endothelin-1 levels and action potential duration during myocardial ischaemia-reperfusion in dogs with and without ventricular fibrillation.

J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl1):S376-379.

Zsáry A, Szűcs S, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Fenyvesi T, Karádi I.

Endothelins: A possible mechanism of cytostatics-induced cardiomyopathy.

Leukemia & Lymphoma, 2004;45, 351-355.

Szűcs A, **Keltai K**, Zima E, Vágó H, Soós P, Róka A, Szabolcs Z, Gellér L, Merkely B.

Effects of implantable cardioverter defibrillator implantation and shock application on serum endothelin-1 and big-endothelin levels.

Clin Sci 2002;103:233S-236S.

Keltai M. és **Keltai K.**

Antikoaguláns kezelés pitvarfibrillációban

Card Hung, 2011;41:278-286.

Keltai M, **Keltai K**,

Új antikoagulánsok a vénás thromboembolia megelőzésében és kezelésében.

Orv Hetil 2011;152(25):983-992.

Keltai K.

Metabolikus szindróma és szívelégtelenség.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2011;6:15-19.

Keltai K.

Hypertonia kezelés szempontjai az alapellátásban.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2011;4:31-34.

Keltai K.

Angiotenzin receptor blokkolók és kombinációik a hypertonia terápiájában.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2010;5:36-38.

Keltai K, Gera I, Gábris K, Orosz M.

Az infektív endocarditis megelőzésének új irányelvei és fogászati-szájsebészeti vonatkozásai.

Fogorvosi szemle 2010;103:115-118.

Keltai K.

Új irányelvek az infektív endocarditis megelőzésében.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2010;4:9-11.

Keltai K.

A dilatatív cardiomyopathia korszerű kezelése.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2009;7:10-18.

Keltai K.

Antithromboticus kezelés pitvarfibrillációban.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2008;6:2-9.

Keltai K.

A béta-blokkolók helye a hypertonia és a szívbetegségek kezelésében.

Magyar Csaláadorvosok Lapja 2008;9:36-38.

Pozsonyi Z, Förhéc Zs, Jánoskúti L, **Keltai K**, Lengyel M,
Prohászka Z.

Alkalmas-e az NT-PROBNP a pitvarfibrilláció sikeres kardioverziója után a tartós
sinus ritmus fennmaradásának előrejelzésére?

Magy Belorv Arch 2007;60:523-529.

Nagy E, Bodó I, Jánoskúti L, Förhéc Zs, **Keltai K**, Zsáry A,
Prohászka Z, Karádi I, Lengyel M.

Protrombotikus markerek változása pitvarfibrilláció elektromos kardioverziója után.

Cardiol Hung 2007;37:166-170.

Zsáry A, Pásztor E, Szücs Sz, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Jánoskúti L,
Fenyvesi T, Karádi I.

Endotelin-1 szintjének változása és anthracyclin okozta cardiomyopathia.

Magy Belorv Arc 2004;57:67-70.

Zsáry A, **Keltai K**.

Acut coronaria szindróma. A nem ST-elevációval járó akut coronaria szindróma kezelése.

Családorvosi Fórum 2003;1:36-44.

Keltai K.

ACE –gátlók helye a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében.

Háziorvos Továbbképző Szemle 2003;8:683-687.

Keltai K.

Vitiumok diagnózisa és gondozása.

Családorvosi Fórum 2002;8:10-16.

Kempler P, Littmann L, Jánoskúti L, **Keltai K**, Szombathy T,
László Z, Zsáry A, Sármán P, Fenyvesi T.

A pitvarfibrilláció non-farmakológiai kezelésének újabb eredményei.

Magy Belorv Arch 1999;52:413-418.

László Z, Kempler P, Jánoskúti L, **Keltai K**, Szombathy T,
Rössler A, Hinghofer-Szalkay H.
Szimulált orthostasis.

Cardiol Hung 1999;2:47-51.

Jánoskúti L, Kempler P, László Z, **Keltai K**, Szombathy T,
Fenyvesi T.

A korai posztinfarktusos periódusban végzett nem invazív tesztek prognosztikai értéke.

Lege Artis Medicinae 1998;8:860-864.

Keltai K, Ökrös P, Kempler P, Jánoskúti L, László Z,
Csaba K, Littmann L.

A P- hullám hiánya az EKG-n.

Magy Belorv Arch 1998;51:363-365.

László Z, Kempler P, Jánoskúti L, **Keltai K**, Fenyvesi T.

Kamrai ritmuszavarok, balkamrafunkció és kamrai utópotenciál összefüggése és követése
myocardialis infarctus után.

Lege Artis Medicinae 1994;4:242-246.

Jánoskúti L, László Z, **Keltai K**.

„Regularisan irregularis” tartós monomorf kamrai tachycardia.

Cardiol Hung 1994;3:43-44.

A téziszfüzet irodalomjegyzéke csak a jelölt publikációit tartalmazza.